

LES CELLULES DIPLOÏDES HUMAINES

MISE EN CULTURE - ENTRETIEN - CONSERVATION

TRAVAIL DU LABORATOIRE DE VIROLOGIE
DE L'HÔPITAL MILITAIRE D'INSTRUCTION DESGENETTES

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le 24 Juin 1964

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

Joseph GIANNUZZI

Ancien Elève de l'Ecole du Service de Santé Militaire

Né le 26 Décembre 1938, à NICE (Alpes-Maritimes)



LYON

Imprimerie BOSC Frères
42, quai Gailleton, 42

1964

LES CELLULES DIPLOÏDES HUMAINES

MISE EN CULTURE - ENTRETIEN - CONSERVATION

TRAVAIL DU LABORATOIRE DE VIROLOGIE
DE L'HÔPITAL MILITAIRE D'INSTRUCTION DES GENETTES

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le 24 Juin 1964

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

Joseph GIANNUZZI

Ancien Elève de l'Ecole du Service de Santé Militaire

Né le 26 Décembre 1938, à NICE (Alpes-Maritimes)



LYON

Imprimerie BOSC Frères
42, quai Gailleton, 42

1964

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

PERSONNEL DE LA FACULTE

Doyens honoraires	M. J. LEPINE, Membre de l'Institut. M. H. HERMANN, Correspondant de l'Institut
Doyen	M. J.-F. CIER.
Assesseurs	MM. M. LEVRAT et L. REVOL.

Professeurs Honoraires : MM. COLLET, GUIART, PATEL, LEPINE, TRILLAT, MOURIQUAND, MAZEL, GARIN, GATE, MARTIN, GABRIELLE, SANTY, DUCLOS, GUILLEMINET, HERMANN, ROCHET.

PROFESSEURS

Clinique urologique	MM. CIBERT.	Clinique traumatologique	
Physique biologique	PONTHUS (dét. à Bey- rout).	des membres	MM. CREYSSEL.
Clinique neuro-psychiatri- que et hygiène mentale	DECHAUME.	Clinique carcinologique	DARGENT.
Chimie organique et toxi- cologie	CHAMBON.	Anatomie pathologique	GUICHARD.
Clinique chirurgicale B	WERTHEIMER.	Pathologie générale et ex- périmentale	GIRARD Paul.
Clinique médicale B	PAUPERT- RAVAULT.	Anatomie	LATARJET.
Clinique et prophylaxie cardio-vasculaires	FROMENT.	Pathologie chirurgicale	PEYCELON.
Clinique médicale C	CROIZAT.	Thérapeutique	GIRARD Marcel.
Chimie biologique et médi- cale	ENSELME.	Pathologie médicale	VACHON.
Clinique chirurgicale A	MALLET-GUY.	Physio-pathologie des voies respiratoires	GALY.
Pharmacie galénique	REVOL.	Radiologie	PAPILLON.
Clinique gynécologique	POLLOSSON.	Clinique des maladies in- fectieuses	JEUNE.
Clinique obstétricale	PIGEAUD.	Hydrologie thérapeutique, climatologie et écologie sociale	GONIN.
Médecine du travail	BOURRET.	Bactériologie	MONNET.
Clinique médicale A	LEVRAT.	Physiologie et pathologie obstétricales	BANSSILLON.
Hygiène et action sanitaire et sociale	SOHIER.	Physiologie B	CHATONNET.
Botanique et cryptogamie.	NETIEN.	Clinique endocrinologique.	GUINET.
Clinique chirurgicale C	BERTRAND.	Clinique de chirurgie or- thopédique	TRILLAT.
Chimie analytique phar- macutique	BADINAND.	Clinique stomatologique	FREIDEL.
Pharmacie chimique et pharmacologie	DREVON.	Clinique de chirurgie et d'orthopédie infantiles	MARION Joseph.
Médecine légale et déonto- logie	ROCHE.	Matière médicale et légis- lation pharmaceutique	DORCHE.
Parasitologie et pathologie exotique	COUDERT.	Histologie et embryologie.	DUMONT Louis.
Clinique d'oto-rhino-laryn- gologie et d'audio-pho- nologie	MOUNIER- KUHN.	Chimie	PERROT.
Clinique ophtalmologique	PAUFIQUE.	Physiologie A	CIER J.-F.
Clinique de dermatologie, syphiligraphie et aller- gologie	THIERS.	Thérapeutique chirurgicale et chirurgie opératoire.	PERRIN J.
Clinique de pneumo-phti- siologie	BRUN.	Clinique de chirurgie car- diaque	MICHAUD Pierre
		Clinique médicale infantile et hygiène du premier âge	X...
		Biologie médicale et phar- macodynamie	X...

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Physique nucléaire appliquée à la médecine	MM. BERGER.
Bactériologie	BERTOYE.
Neuro-chirurgie	MANSUY.
Chimie pharmaceutique	COLLET.
Clinique de pédiatrie	SARROUY.
Climatologie	LACROIX.
Clinique chirurgicale propédeutique	LIARAS.
Neuro-chirurgie	LEQUIRE.
Médecine générale	REVOL.
Thérapeutique chirurgicale	GOINARD.

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Parasitologie	MM. ROMAN.
Pharmacie chimique et pharmacologie	CIER André
Anatomie pathologique	FEROLDI.
Physique biologique	MORET.

MAÎTRES DE CONFERENCES AGREGES TITULAIRES

Chimie biologique	MM. CREYSSSEL Roger	Electro-radiologie	MM. BUFFARD.
Hygiène	THIVOLET.	Médecine générale et thé-	
Parasitologie	GARIN.	rapeutique	LEJEUNE.
Electro-radiologie	PINET.	Stomatologie	de MOURGUES
Botanique et cryptogamie	ODDOUX.		F
Chimie analytique	de SOLLIERS.	Maladies infectieuses	NAUSSAC.
Médecine du travail	TOLOT.	Chirurgie générale	REBOUILLAT.
Médecine générale	DESPIERRES.	Pédiatrie	ROMAGNY.
Neuro-psychiatrie	GUYOTAT.	Médecine générale	DELAHAYE J.P.
Chirurgie générale	DESCOTES.	Anesthésiologie	DELEUZE R.
Pathologie expérimentale	JOUVET.	Electroradiologie diagnostic	
Physique biologique	PEYRIN.	et thérapeutique	GIRAUD M.
Anatomie pathologique	TOMMASI.	Anesthésiologie	MICHEL.

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES STAGIAIRES

Anatomie	MM. DUROUX.	Biologie médicale et phar-	
Thérapeutique	BRETTE.	macodynamie	MM. FAUCON.
Anatomie	BOUCHET.	Physiologie	FLANDROIS.
Hématologie	FAVRE-GILLY.	Bactériologie	VIALIER-
Histologie et embryologie	GIROD.		RAYNARD.
Chimie biologique	GRAS.	Médecine générale	FRIES.
Chimie analytique	MALLEIN.	Médecine générale	LAMBERT.
Hygiène	RIFFAT.	Chirurgie générale	MICHOULIER
		Pédiatrie	GILLY.

AGREGES EN EXERCICE

Obstétrique	MM. BIRTHIAULT.	Chirurgie générale	MM. FRANCILLON
Pédiatrie et puériculture	FRANÇOIS.	Chirurgie générale	SAUBIER.
Oto-rhino-laryngologie	GIGNOUX.	Neuro-psychiatrie	SCHOTT.
Chirurgie générale	GUILLEMIN.	Neuro-chirurgie	ALLEGRE.
	JAUBERT-	Electro-radiologie	CHASSARD.
	DE-BEAUJEU.	Orthopédie	FAYSSE.
Chirurgie générale	MARION Pierre.	Oto-rhino-laryngologie	GAILLARD.
Médecine générale	PLAUCHU.	Médecine générale	GARDE.
Médecine générale	PONT.	Ophtalmologie	HUGONNIER.
Chirurgie générale	SAUTOT.	Pneumo-ptisiologie	KALB.
Médecine générale	TRAEGER.	Médecine générale	LARBRE.
Médecine générale	VIGNON.	Chirurgie générale	MARET.
Ophtalmologie	BONAMOUR.	Médecine générale	MORNEX.
Médecine légale	COLIN.	Médecine générale	NORMAND.
Dermatologie	COLOMB.	Médecine générale	PERRIN André
Chirurgie générale	de MOURGUES	Pédiatrie et puériculture	BETHENOD.
	Georges.	Stomatologie	DUMAS.
Médecine générale	DEVIC.	Obstétrique	GARMIER.
Obstétrique	DUMONT	Médecine générale	NOEL.
	Martial.	Médecine générale	ROBERT.
Urologie	DURAND.	Orthopédie	SCHNEPP.

EXAMINATEURS DE LA THESE

Président : M. BERTOYE ; *Assesseurs* : MM. CIER A.,
FEROLDI et ROBERT.

La Faculté de Médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner ni approbation, ni improbation.



A LA MEMOIRE DE MON PERE

A MA MERE

Qui a consenti pour moi d'immenses sacrifices.

Bien modeste témoignage de ma reconnaissance et de mon affection.

Sa joie sera ma plus grande récompense.

A MA FEMME

Avec toute ma tendresse.

A MES BEAUX PARENTS

A TOUTE MA FAMILLE

A MES AMIS

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR A. BERTOYE

Professeur de Bactériologie

Sous-Directeur de l'Institut Pasteur de Lyon

Il nous a fait le grand honneur d'accepter la présidence de cette Thèse.

Son enseignement clinique et bactériologique fut pour nous des plus précieux.

Qu'il veuille bien trouver ici le témoignage de notre reconnaissance et de notre profond respect.

A NOS JUGES

MONSIEUR LE PROFESSEUR A. CIER

Professeur de Pharmacie Chimique et Pharmacologie

MONSIEUR LE PROFESSEUR FEROLDI

Professeur d'Anatomie pathologique

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ ROBERT

Nous leur sommes reconnaissant d'avoir
bien voulu accepter de juger ce travail.

A MONSIEUR LE MÉDECIN LIEUTENANT-COLONEL
P. MAITRE

*Spécialiste des Hôpitaux Militaires
Médecin-Chef du Laboratoire de Bactériologie
et du Service des Contagieux
de l'Hôpital Militaire d'Instruction Desgenettes*

Durant les trois années passées dans son laboratoire, il nous a initié avec bienveillance aux techniques virologiques.

Nous le remercions de nous avoir inspiré ce travail et le prions de trouver ici l'expression de notre vive gratitude et de notre respectueux attachement.

A MONSIEUR LE MÉDECIN GÉNÉRAL INSPECTEUR
R. BORON

*Professeur Agrégé du Val-de-Grâce
Directeur de l'Ecole du Service de Santé Militaire
et de l'Hôpital Militaire d'Instruction Desgenettes*

A MONSIEUR LE MÉDECIN COLONEL A. CAMELIN

*Professeur Agrégé du Val-de-Grâce
Sous-Directeur de l'Ecole du Service de Santé Militaire
Médecin-Chef de l'Hôpital Militaire d'Instruction Desgenettes*

A NOS MAÎTRES
DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE LYON
DES HÔPITAUX CIVILS
DE L'HÔPITAL MILITAIRE D'INSTRUCTION DESGENETTES

En particulier :

A MONSIEUR LE MÉDECIN COMMANDANT BONNET

Spécialiste des Hôpitaux Militaires

A MONSIEUR LE MÉDECIN CAPITAINE PAYEN

Assistant des Hôpitaux Militaires

Au cours d'une année passée dans leur service, nous avons bénéficié de leur enseignement clinique, qui fut riche pour nous en connaissances diverses.

Qu'ils trouvent ici un témoignage de notre reconnaissance et de notre gratitude.

A MONSIEUR LE MÉDECIN CAPITAINE FAVIER

Assistant des Hôpitaux Militaires

Nous le remercions des conseils qu'il nous a prodigué et de nous avoir guidé pas à pas à chaque instant dans l'élaboration de ce travail, ne ménageant ni son temps, ni ses encouragements.

Nous sommes heureux de pouvoir ici lui exprimer toute notre reconnaissance.

A MESSIEURS LES MÉDECINS CAPITAINES

LABOUREL ET DOUCHET

Assistants des Hôpitaux Militaires

A TOUS NOS CAMARADES DE PROMOTION

ET EN PARTICULIER

LE MÉDECIN LIEUTENANT M. PEILLON

LE MÉDECIN LIEUTENANT R. SIREIX

LE MÉDECIN LIEUTENANT G. SANTUCCI

LE MÉDECIN LIEUTENANT M. TSCHUPP

En souvenir des jours et parfois même des nuits que nous avons passés au laboratoire, durant ces trois années où nous avons partagé les mêmes joies, les mêmes succès et les mêmes soucis,

Nous remercions très vivement le personnel du laboratoire de bactériologie et de virologie, et tout particulièrement :

MADemoiselle DEROSNE

MADAME ETTZEVE

Qui nous a initié aux techniques du laboratoire et dont les conseils nous ont été très précieux.

Nous lui adressons nos sincères remerciements pour sa collaboration dans la réalisation de ce travail.

Nos remerciements vont également au personnel de la maternité de Grange Blanche, pour l'aide qu'il nous a apportée.

INTRODUCTION

L'intérêt d'un système cellulaire réceptif à un grand nombre de virus est en virologie évident. C'est pourquoi le Laboratoire de virologie de l'H.M.I. Desgenettes s'est préoccupé dès la fin de l'année 1962, d'établir des souches de fibroblastes embryonnaires humains en appliquant les techniques décrites par les auteurs qui les premiers, ont introduit l'usage des cellules diploïdes humaines. Il nous a été donné avec notre camarade, le docteur Tschupp de participer, sous la direction immédiate du Médecin Capitaine Favier, aux manipulations de mises en culture et en subcultures de six souches cellulaires ; c'est dire qu'il s'agit d'un travail d'équipe.

Les résultats obtenus ne sont malheureusement que partiels : pour des raisons diverses l'étude de ces souches cellulaires et de leur sensibilité aux virus, a dû être interrompue pendant plusieurs mois.

La première partie de notre travail se propose de rapporter les données essentielles fournies par la littérature au sujet des cellules diploïdes humaines.

Nous exposerons les principales applications que ce nouveau système a déjà reçues.

La seconde partie est consacrée aux techniques mises en œuvre pour l'établissement de ces six souches cellulaires dont dispose actuellement le Laboratoire et qu'il conserve dans l'azote liquide. Nous insisterons plus particulièrement sur certains points qui nous ont paru importants pour la réussite des cultures.

Le terme de cellules diploïdes évoque tout naturellement l'idée de caryotype. L'analyse précise d'un lot de chromoso-

mes est affaire de spécialistes et nous n'avons pu l'aborder ; nous nous sommes limités à effectuer certaines numérations qui nous ont permis d'aboutir à la notion de souches de cellules diploïdes sans préjuger de l'intégrité des chromosomes eux-mêmes.

PREMIERE PARTIE

DONNEES FOURNIES PAR LA LITTERATURE

CHAPITRE PREMIER

CARACTERES FONDAMENTAUX DES DIFFERENTS SYSTEMES DE CULTURES CELLULAIRES

Jusqu'en 1962 on ne connaissait que deux grandes catégories de cultures de cellules : *les lignées cellulaires et les cellules de première explantation*.

Tous les Laboratoires de Virologie utilisent couramment diverses lignées :

— Cellules HeLa établies en 1951 à partir d'un carcinome du col utérin [10].

— Cellules KB dérivées en 1955 d'un carcinome de la cavité buccale [7].

— Cellules *L* mises en culture par Earle en 1940 à partir du mésentère d'une souris traitée au méthyl-cholantène [6].

Les avantages que présentent ces lignées cellulaires sont nombreux. Leur culture est aisée, les subcultures peuvent être réalisées de façon indéfinie tout en conservant une vitesse de multiplication extrêmement rapide. Ces cellules en outre s'adaptent facilement à différents milieux dont certains sont peu coûteux. Les lignées cellulaires permettent enfin l'isolement et la culture de nombreux virus pathogènes pour l'homme.

Un caractère limite néanmoins les possibilités d'utilisation de ces systèmes cellulaires : toutes les lignées en effet qu'elles soient issues de tissus cancéreux ou de tissus normaux, ainsi que nous le verrons plus loin, présentent des

signes indiscutables de malignité. Leur morphologie observée sur des lamelles colorées à l'hématéine éosine est déjà évocatrice : les cellules se montrent extrêmement polymorphes ; il existe en particulier une anisocaryose manifeste avec anomalies nucléolaires se traduisant par l'existence de nucléoles géants et nombreux.

Tous ces caractères morphologiques sont identiques à ceux que l'on observe sur un tissu cancéreux prélevé *in vivo*.

L'analyse caryologique précise ce caractère de malignité. Les cellules sont hétéroploïdes et plus précisément hypotétraploïdes. C'est ainsi par exemple que les cellules dérivées de tissus humains ont en moyenne 70 chromosomes. L'aneuploïdie est également de règle. Les anomalies de la morphologie des chromosomes sont nombreuses : allongement ou raccourcissement des bras, formation de nouveaux centromères, réarrangements, etc...

A tous ces caractères morphologiques et structuraux s'ajoute le pouvoir oncogène de ces cellules *in vivo* :

— L'inoculation dans la poche jugale du hamster doré est suivie de l'apparition d'une prolifération tumorale ayant les caractères histologiques d'une tumeur maligne.

— L'inoculation à des malades atteints de cancer à la phase terminale entraîne le même résultat.

Une lignée est donc une population cellulaire capable de cultiver *in vitro* par passages en série de façon indéfinie. Le caryotype se montre totalement différent de celui du tissu d'où dérive la culture [14].

Sur le plan pratique cette malignité cellulaire entraîne deux conséquences :

1. Les lignées cellulaires ne peuvent évidemment être utilisées pour cultiver des virus destinés à la préparation de vaccin.

2. La population cellulaire d'une lignée donnée est extrêmement hétérogène si bien que l'emploi des lignées cel-

lulaires est exclus pour certaines études. On avait pensé que les techniques de clonage permettraient d'obtenir une population cellulaire homogène, en réalité les clones se révèlent aussi disparates que la culture de départ [3].

Les inconvénients des lignées cellulaires expliquent l'extension prise par les cultures cellulaires de première explantation, que celles-ci soient d'origine humaine ou d'origine animale.

On sait que classiquement une culture primaire est une population cellulaire que l'on obtient à partir d'un tissu donné, que l'on cultive *in vitro* et qui n'a été l'objet d'aucune subculture.

Les primocultures issues de tissus normaux humains n'ont, à quelques exceptions près, que des usages limités en pratique virologique courante.

Les cellules amniotiques sont certes utilisées dans les laboratoires. Il est facile d'obtenir des membranes mais leur mise en culture est vouée à l'échec dans un cas sur trois au moins. Par ailleurs leur sensibilité aux virus n'est guère supérieure à celles des lignées cellulaires.

Les cellules thyroïdiennes représenteraient un système offrant une réceptivité à une gamme étendue de virus mais leur emploi est limité en raison de la difficulté d'obtenir le tissu à traiter.

Quant aux cellules rénales embryonnaires dont on connaît la sensibilité à la majorité des virus pathogènes pour l'homme, y compris les rhinovirus, elles ne sauraient évidemment être un matériel d'utilisation courante.

Ces faits expliquent que l'on ait eu recours à des cultures cellulaires d'origine animale et plus particulièrement d'origine simienne : la plupart des virus humains peuvent en effet y être cultivés.

Depuis plusieurs années la mise en cultures de cellules épithéliales de rein de singe s'opère à l'échelle industrielle. Ces cellules sont très largement utilisées tant pour l'isolement des virus dans les laboratoires de diagnostic que pour

la fabrication des vaccins. Mais ce système cellulaire est très onéreux.

L'inconvénient majeur des primocultures est représenté soit par la difficulté de se procurer le tissu à mettre en culture et le faible volume de cellules recueillies, soit encore par leur prix de revient élevé.

Pour tenter de minimiser ces inconvénients, de nombreux essais ont été entrepris depuis longtemps pour réaliser des subcultures à partir de ces primocultures. Le résultat fut décevant. Dans la majorité des cas en effet le nombre de passages que l'on peut effectuer demeure extrêmement réduit. Très vite on assiste à un ralentissement de la multiplication cellulaire qui devient telle que la culture cesse. C'est ainsi par exemple que les cellules amniotiques humaines et les cellules épithéliales de reins de singe Rhésus ou Cynomolgus ne permettent que 6 à 8 passages en série.

Toutefois certaines cultures de tissus embryonnaires humains dérivées de poumon, de muscle, de rein et de peau ont pu être repiquées pendant une année [4, 5]. On doit souligner qu'au fil des passages la morphologie des cellules demeure inchangée ; de même le caryotype est celui du tissu qui a donné naissance à la culture.

Il est donc possible de définir, à côté des lignées cellulaires et des cultures de première explantation, un troisième type de culture de cellules : la « *souche cellulaire* » [14], qui englobe toute la série de subcultures réalisées à partir d'une primoculture. Mais deux caractères principaux la distinguent des lignées cellulaires :

- 1) le nombre limité de passages ;
- 2) l'intégrité de la morphologie et du caryotype.

Dans quelques cas, l'évolution au cours des subcultures est tout autre. Après quelques repiquages on voit apparaître brusquement quelques cellules dont la morphologie diffère totalement de celle des éléments constituant la population primitive.

Très vite ces cellules donnent naissance à des plages remarquables par leur bord net, le polymorphisme des éléments cellulaires et les anomalies nucléaires. Ces plages de cellules anormales deviennent de plus en plus nombreuses au fil des repiquages et arrivent à remplacer dans leur totalité les cellules primitives. La culture présente alors les mêmes caractères morphologiques que les lignées cellulaires. Elle en présente également certaines particularités telle que la multiplication active des cellules et l'accroissement de la glycolyse anaérobie. Ces caractères de malignité sont confirmés par les modifications importantes du caryotype : hétéroplœdie, aneuploïdie et altérations de la morphologie des chromosomes. Tous ces caractères sont transmis aux générations cellulaires ultérieures. Dans certains cas cette transformation maligne apparaît de façon précoce. C'est ainsi qu'Hayflick a pu l'observer dans une culture de cellules amniotiques 35 jours seulement après la mise en culture [13].

Plus de 200 lignées cellulaires ont pu être établies au cours de ces 20 dernières années. Il convient de souligner que l'éventualité de la transformation en lignée demeure rare et intervient de façon fortuite, son déterminisme est totalement inconnu, mais il relève d'un processus analogue à celui de la transformation maligne *in vivo*.

Les cellules primaires de rein de singe présentent outre l'impossibilité de donner lieu à de nombreuses subcultures, un autre inconvénient : elles hébergent très souvent des virus latents dont quarante au moins ont pu jusqu'ici être identifiés [17-35].

Ces virus simiens constituent souvent des agents qui entravent les tentatives d'isolements de virus. Ils ne se révèlent en effet qu'assez tardivement manifestant alors leur pouvoir cytopathogène et interdisant ainsi toute observation et tout repiquage sur des cultures neuves.

Deux virus simiens revêtent une importance particulière :

— le virus B qui, inoculé à l'homme par voie parentérale, provoque une maladie rapidement mortelle ;

— le SV₄₀ dont les propriétés oncogènes ont été mises en évidence [15] :

In vivo chez le hamster : l'inoculation dans la poche jugale entraîne l'apparition d'une tumeur maligne.

In vitro, l'introduction du SV₄₀ dans une culture de fibroblastes humains normaux entraîne la transformation de celle-ci en lignée cellulaire.

Ce virus résiste en outre aux doses de formol utilisées pour inactiver les virus des préparations vaccinales [11].

On doit néanmoins souligner que les babouins et singes verts qui servent en France à la fabrication du vaccin antipoliomyélitique ne sont pas infectés par le SV₄₀. La double inactivation au formol et à la bêta-propiolactone préconisée par Lépine a en outre la propriété d'inactiver le SV₄₀.

On conçoit dans ces conditions que le problème de l'utilisation des cultures de cellules simiennes pour la fabrication de vaccins soit entièrement reposée.

Une solution semble avoir été trouvée par Hayflick et Moorhead [14] qui proposent un système cellulaire nouveau constitué par une population de fibroblastes humains et qui présentent les caractères fondamentaux suivants :

— Possibilité de subcultures pendant plus de six mois.

— Stabilité du nombre des chromosomes avec conservation de l'intégrité de leur morphologie.

— Absence de tout pouvoir oncogène in vivo et in vitro.

— Absence de virus latents.

— Grande réceptivité pour la plupart des virus pathogènes pour l'homme.

C'est avec plus de détails que va maintenant être décrite l'histoire naturelle d'une souche de cellules diploïdes humaines.

CHAPITRE II

NAISSANCE, VIE ET MORT D'UNE SOUCHE DE CELLULES DIPLOIDES HUMAINES

Toutes les souches de cellules diploïdes humaines ont une évolution identique quelle que soit la nature du tissu qui leur a donné naissance. Hayflick et Moorhead [14] distinguent trois phases dans la vie d'une souche.

PHASE I

Il s'agit uniquement de la primoculture. Cette phase débute au moment de la mise en culture du tissu et prend théoriquement fin lorsque la couche monocellulaire est devenue complète.

La durée de cette phase dépend de la technique utilisée pour établir la primoculture. La trypsination permet d'obtenir une suspension cellulaire suffisamment importante pour que la couche monocellulaire soit constituée en une semaine. Avec la technique des explants il faut attendre deux à trois semaines avant d'atteindre le même résultat.

PHASE II.

C'est la première subculture qui marque le début de la phase II. Celle-ci se caractérise essentiellement par deux phénomènes :

- une activité métabolique intense ainsi qu'en témoigne l'acidification très rapide du milieu de culture ;
- une extraordinaire activité mitotique.

Afin de maintenir continuellement les cultures dans la phase logarithmique de croissance, les subcultures doivent être réalisées deux fois par semaine, un flacon de culture donnant naissance à deux flacons identiques au flacon « père » ; la couche monocellulaire est reformée en trois jours.

La durée de la phase II varie selon les souches cellulaires ; elle s'étale de deux à six mois.

PHASE III

Au cours de cette phase la culture décline peu à peu et meurt.

Certains phénomènes permettent de déceler de façon précoce le début de cette phase.

C'est tout d'abord l'apparition dans la culture de débris très fins qui trouvent vraisemblablement leur origine dans la nécrose cellulaire.

C'est en outre la constatation d'un net ralentissement de l'activité mitotique.

Au fil des subcultures réalisées en série, ces phénomènes vont aller en s'accroissant.

— Les débris s'agglutinent et forment des masses plus ou moins volumineuses qui adhèrent aux cellules.

— Les mitoses se font rares et la couche monocellulaire se reconstitue de façon toujours plus lente.

Dans le même temps apparaissent des modifications de la morphologie cellulaire :

— Les cellules perdent leur aspect fusiforme et ont tendance à s'étaler.

— Certaines cellules en interphase ont des noyaux dont l'aspect est modifié : ils deviennent polymorphes, accusant en outre des variations importantes dans leur taille ; les nucléoles toutefois ne présentent aucune anomalie.

Un fait est remarquable au cours de cette lente dégénérescence qui s'étale sur deux ou trois mois : l'activité métabolique demeure importante ainsi qu'en témoigne la production d'acide. Ce n'est qu'au stade ultime que l'activité métabolique connaît un net ralentissement.

L'évolution des souches de cellules diploïdes vers la mort apparaît comme un phénomène inéluctable.

Aucun facteur capable de le rendre réversible n'a pu être trouvé.

De même aucune explication valable n'est fournie pour rendre compte de cette dégénérescence.

L'hypothèse de l'absence dans le milieu d'un métabolite ou la présence de substances cytotoxiques dans le sérum peut être définitivement écartée ; de même est à éliminer l'intervention de virus latents ou de mycoplasmes.

Certains ont avancé que divers métabolites existant dans les cellules de première explantation ne pourraient être synthétisés *in vitro*. L'épuisement progressif de cette réserve serait à l'origine de la dégénérescence de la culture. Hayflick [14] réfute cette argumentation à l'aide d'un calcul extrêmement simple. Il fait remarquer qu'une cellule arrivée à la 50^e génération représente une population totale de 10^{35} cellules. Il faudrait donc supposer une réserve minima de 10^{35} molécules d'un métabolite donné dans la cellule originelle. Si l'on prend comme exemple l'hydrogène il est aisé de calculer que 10^{35} molécules d'hydrogène pèsent $3,3 \times 10^{-9}$ gm ; or une cellule diploïde a un poids estimé approximativement à 2×10^{-9} gm.

Pour d'autres il existerait un élément indispensable à la survie des cellules dont la concentration dépendrait de deux facteurs :

— soit vitesse de synthèse ralentie avec comme conséquence une réduction progressive de cet élément qui atteindrait un taux critique vers la cinquantième génération ;

— soit libération plus grande *in vitro* qu'*in vivo* de cet élément dans le milieu ambiant.

En fait le déterminisme de la phase III reste à trouver.

Le vieillissement suivi de la mort n'est pas la seule destinée que peut connaître une souche de cellules diploïdes. La transformation en lignée cellulaire peut intervenir à un stade quelconque de la phase II. Cette éventualité est extrêmement rare. Elle entraîne néanmoins la nécessité d'étudier l'évolution du caryotype pendant la vie de la souche cellulaire.

Au cours de la phase I, le caryotype est rigoureusement normal, les cellules sont à la fois diploïdes et euploïdes. Sans doute rencontre-t-on quelques cellules tétraploïdes ou présentant certaines anomalies de la morphologie des chromosomes, mais leur nombre est toujours très faible et reste dans les limites des altérations relevées *in vivo* dans le sang périphérique de sujets normaux.

Pendant la phase II le caryotype demeure rigoureusement stable. Moorhead [24] ne remarque aucune anomalie lors de l'analyse de 423 cellules de la souche W.I. 38.

A partir de la quarantième génération certaines anomalies du caryotype peuvent apparaître mais leur nombre demeure toujours réduit. Moorhead relève une anomalie parmi 206 cellules de la souche W.I. 26, étudiées après la quarantième génération.

Au cours des 10 passages qui précèdent l'extinction de la souche le nombre des tétraploïdies n'est pas augmenté ; il oscille entre 1 et 3 %. En revanche l'aneuploïdie peut s'observer dans 2 à 30 % des métaphases.

L'observation de ces anomalies n'implique pas obligatoirement l'éventualité de la transformation de la souche en lignée. Moorhead en effet a constaté que l'aneuploidie relevée dans les souches W.I. 26 et W.I. 38 n'était suivie d'aucune modification de la vitesse de croissance ou de la morphologie cellulaire. Aucune des deux souches n'a donné naissance à une lignée.

Par ailleurs les tests d'hétérotransplantation et d'homotransplantation n'ont donné lieu à aucune prolifération tumorale.

Les auteurs estiment que ces anomalies du caryotype sont imputables au phénomène de senescence. Ils constatent en effet que ces modifications sont contemporaines des altérations observées dans les cultures et annonciatrices du déclin de la souche. Par ailleurs les auteurs rapprochent ces faits des constatations effectuées par Jacobs [18] qui observe dans le sang périphérique une augmentation progressive de l'hypodiploïdie à mesure que l'âge du sujet devient plus élevé.

CHAPITRE III

UTILISATION DES SOUCHES DIPLOIDES HUMAINES

En raison des avantages qu'elles présentent, les cellules diploïdes humaines ouvrent la voie à de nombreuses applications.

Avantages

1. — L'obtention et le prix de revient du matériel à mettre en culture ne posent aucun problème.

2. — On dispose d'une population cellulaire qui est :

— homogène et présente les caractères morphologiques et caryotypiques des cellules humaines normales ;

— réceptive à la plupart des virus pathogènes pour l'homme. Les titres infectieux obtenus sont aussi élevés que sur les autres systèmes cellulaires. Les virus ne subissent apparemment aucune modification de leur constitution antigénique ;

— exempte de virus latents ;

— dénuée de tout pouvoir oncogène.

3. — Certains ont objecté que la vie limitée d'une souche cellulaire pouvait constituer un inconvénient réduisant l'intérêt des souches de cellules diploïdes.

Cette objection peut facilement être réfutée ; l'exemple suivant est en effet démonstratif [14].

Soit une ampoule contenant 2×10^6 cellules diploïdes à la 8^e génération et conservée dans l'azote liquide. Après décongélation la suspension cellulaire est mise en culture dans un flacon plat dont les parois ont une surface de 35 cm². La couche monocellulaire une fois reconstituée, la 9^e génération est trypsinée puisensemencée dans un flacon plus grand dont la paroi mesure 60 cm² environ. La subculture suivante est réalisée dans un récipient ayant une surface de 100 cm² environ. Pour la 11^e génération c'est un flacon de 1 litre avec paroi de 170 cm² que l'en emploie.

Si l'on utilise désormais des flacons de 1 litre et si l'on répartit dans deux flacons la suspension cellulaire recueillie à partir d'un flacon, on disposera à la 18^e génération cellulaire, de 128 flacons de culture.

Il est aussi possible de conserver à l'état congelé, des cellules appartenant à diverses générations d'une même souche dont toute l'évolution est déjà connue.

Ce procédé offre pour un laboratoire des possibilités de travail pendant des années.

Applications

Les cellules diploïdes humaines sont appelées à donner lieu à de nombreuses applications.

La sensibilité aux virus, rend ce système cellulaire particulièrement intéressant pour l'isolement des virus humains.

L'absence de pouvoir oncogène et de virus latent fait des cellules diploïdes le système cellulaire idéal pour la préparation de vaccins.

L'homogénéité de la population cellulaire avec conservation du caryotype normal rend possible toute une série d'études jusqu'ici d'abord difficile.

D'autres perspectives sont également offertes.

C'est ainsi par exemple que des anomalies héréditaires du caryotype sont conservées dans les souches cellulaires. Les

souches établies à partir de sujets atteints de mongolisme ont 47 chromosomes [14], les souches dérivées des tissus d'un sujet présentant un syndrome de Turner posséderont 45 chromosomes [14]. Certains auteurs ont pensé qu'il serait peut être possible d'étudier à l'aide de souches cellulaires certaines anomalies biochimiques héréditaires. L'abord de ce problème se révèle difficile. En effet les cellules mises en culture ressemblent rarement aux cellules du tissu d'origine ; elles perdent en particulier leur spécialisation fonctionnelle [22]. Des essais ont néanmoins été faits qui consistent à sélectionner des sujets porteurs d'une maladie génétique connue et à comparer sur le plan morphologique et biochimique, les cultures de leurs cellules avec celles dérivées des sujets normaux. Certains résultats ont pu être obtenus concernant par exemple la galactosémie [19] ou l'acatalasie [28]. De telles études se heurtent néanmoins à de nombreuses difficultés. Il est possible d'admettre en effet que les souches de cellules diploïdes ressemblent aux cellules du tissu qui leur a donné naissance mais il n'est pas possible en l'état actuel de nos connaissances, de préciser si cette ressemblance est partielle ou complète et si par ailleurs elle s'applique à tous les types de cellules du donneur ou seulement à certains d'entre eux.

C'est l'histoire partielle de six souches de cellules diploïdes humaines, établies au Laboratoire de l'H.M.I. Desgenettes que nous allons maintenant rapporter.

DEUXIEME PARTIE

TRAVAIL PERSONNEL

CHAPITRE PREMIER

MATERIELS ET TECHNIQUES

Nous insisterons dans ce chapitre sur certains points particuliers qui nous ont paru importants pour la culture des cellules diploïdes.

Nous avons utilisé des fœtus pour établir nos cultures cellulaires. Rien ne s'oppose à l'emploi de tissus adultes.

Les fœtus

Il s'agit de fœtus expulsés à l'occasion d'avortement dont l'étiologie demeure le plus souvent obscure et dont l'âge est des plus variables allant de 1 à 5 mois.

Sitôt expulsé le fœtus est introduit dans un bocal contenant de la solution de Hanks additionnée de pénicilline et de streptomycine à fortes concentrations. Le fœtus ainsi traité, parvient au laboratoire dans des délais variant de une à douze heures après l'avortement.

Les fœtus macérés ne sont évidemment pas retenus. Il en est de même pour ceux qui présentent un aspect hémorragique. On ne traite que les sujets paraissant indemnes de tout traumatisme et dont le revêtement cutané est uniformément rosé.

Dès sa réception au laboratoire, le fœtus est abondamment lavé dans plusieurs bains de solution de Hanks contenant de fortes concentrations d'antibiotiques. Les prélèvements d'organes ou de tissus sont alors effectués de façon aseptique. Les fragments obtenus sont soumis à plusieurs lavages afin d'éliminer le maximum d'hématies ; ils sont

ensuite débités en fragments plus petits ayant environ 0,5 cm de côté. Après un nouveau lavage en solution saline tamponnée, ceux-ci sont plongés dans du milieu nutritif contenant 10 % de sérum de veau.

Les fragments sont ainsi conservés au réfrigérateur à + 4°C pendant 48 heures, délai suffisant pour connaître le résultat des contrôles de stérilité. On doit mentionner que la conservation dans ces conditions est possible pendant environ trois semaines [4].

Réalisation des primo-cultures

Toutes nos cultures cellulaires ont été obtenues par tryptisation selon la technique classique de Yougner effectuée à l'aide d'un flacon type Rappaport, l'agitation étant réalisée par un agitateur magnétique.

La digestion est assurée par une solution de trypsine à 0,25 gm. p. 100 dans de la solution de Hanks ne contenant ni calcium ni magnésium.

Chaque décantation est effectuée après une digestion de 20 minutes.

Dès ce stade il est possible de prévoir si la mise en culture sera ou non couronnée de succès. Il suffit pour ce faire d'examiner au microscope un échantillon de la suspension cellulaire placé dans une cellule de Nageotte. La culture cellulaire sera satisfaisante si l'on observe des cellules nombreuses, d'aspect réfringent de 12 millimicrons de diamètre à contours crénelés et à noyaux bien visibles. Ces cellules sont rencontrées soit à l'état isolé, soit en petits placards de quelques éléments.

Le pronostic en revanche est défavorable si les cellules sont observées en petit nombre, présentent un aspect flou et un noyau peu visible. Un élément particulièrement péjoratif est constitué par la présence de nombreux débris tissulaires non digérés flottant dans la suspension.

Après centrifugation à froid et à faible vitesse (600 tours minutes) et élimination du liquide surnageant, le culot

cellulaire est remis en suspension dans du milieu de Eagle contenant 10 % de sérum de veau.

La viabilité de la suspension est appréciée par la numération des cellules après traitement au bleu trypan. La suspension cellulaire est diluée de façon à obtenir une concentration de 500 000 cellules par ml. Elle est ensuite répartie dans des flacons plats de 200 ml dont les parois mesurent 10 cm $\times$ 6 cm. Chaque flacon reçoit 20 ml de suspension. Pendant cette opération l'homogénéité est maintenue par l'agitation réalisée à l'aide d'un barreau magnétique.

Les flacons sont incubés à 37°C ; le milieu est changé en totalité au bout de 24 heures. La couche monocellulaire est complète en 4 à 7 jours.

Réalisation des subcultures

Les subcultures doivent être réalisées de façon régulière deux fois par semaine [14]. Dans ces conditions la culture est continuellement maintenue en phase logarithmique de croissance et l'acidité du milieu n'est pas trop importante. On admet par ailleurs qu'un passage équivaut à une génération cellulaire.

Le protocole expérimental est le suivant :

On ajoute à un flacon une quantité de solution de trypsine chauffée à 37°C, juste suffisante pour recouvrir la couche monocellulaire. Le flacon est ensuite posé à plat sur la table à la température du laboratoire. Au bout d'une minute environ, la solution de trypsine est éliminée. Le décollement des cellules s'opère au bout de 5 à 15 minutes. Les cellules sont alors rassemblées dans un peu de milieu et la dissociation est achevée par plusieurs pipetages. Ce temps est important car si les cellules ne sont pas convenablement dissociées, les subcultures contiendront de nombreux micro-explants qui entraîneront la perte de la culture de façon précoce. Les cellules une fois bien isolées on ajoute une

quantité de milieu suffisante pour pouvoir ensemen-
cer deux flacons de même type que le flacon père.

Le milieu

Le milieu classiquement utilisé est le milieu de Eagle B.M. 1955 contenant 10 % de sérum de veau.

Nous avons été amenés à employer également le milieu de Eagle M.E.M. 1959 ainsi que le milieu de Eagle M.E.M.S. contenant les acides aminés non essentiels.

Les antibiotiques introduits dans le milieu sont :

- pénicilline 100 unités par ml ;
- streptomycine 10 microgrammes par ml.

Nous n'avons pas utilisé l'auroéomycine à la dose de 50 microgrammes par ml qui aurait l'avantage d'inhiber la culture des Mycoplasmes.

Conservation des cellules

A. — Préparation des cellules.

La trypsination d'un flacon est réalisée selon la technique déjà décrite. Les cellules décollées et isolées sont reprises dans un volume connu mais peu important de milieu de Eagle contenant 10 % de sérum de veau et 10 % de glycérine stérilisée à l'autoclave.

La suspension cellulaire est ajustée à 2×10^6 cellules par ml puis répartie en ampoules à raison de 1 ml par ampoule.

B. — Congélation des cellules.

Les ampoules scellées sont maintenues à $+4^{\circ}\text{C}$ pendant au moins 3 heures. Après agitation vigoureuse on procède à la congélation. Celle-ci est réalisée soit à l'aide d'appareils

permettant un abaissement de température de 1°C à 4°C par minute (Biological freezer Linde B.F. 1 ou B.F. 5), soit plus simplement en plaçant les ampoules dans un réfrigérateur à —70°C pendant 12 heures.

C. — *Conservation.*

Les ampoules congelées sont soit maintenues à —70°C, soit plongées dans l'azote liquide.

D. — *Remise en culture.*

L'ampoule congelée est mise au bain marie à +40°C pendant 10 à 15 minutes.

Le contenu est transvasé à l'aide d'une pipette dans un flacon auquel on ajoute la quantité de milieu voulue.

Le milieu est changé après 24 heures ; il est ensuite renouvelé périodiquement jusqu'à ce que la couche monocellulaire soit reconstituée.

Préparation des chromosomes

A. — *Techniques.*

Nous avons utilisé trois techniques afin de déterminer celle qui tout en étant facile à réaliser donnerait les meilleurs résultats :

1. Technique de Rothfels et Siminovitch modifiée par Moorhead [23]. Elle nécessite un culot cellulaire obtenu par trypsination d'un flacon plat de 200 ml. Le choc osmotique est réalisé par addition d'eau déminéralisée. Le fixateur est un mélange d'alcool méthylique acide acétique 3/1. Les préparations sont colorées soit à l'acéto-orcéine, soit au Giemsa.

2. Technique de Prunieras [30]. Il s'agit d'une modification de la précédente ayant pour but de rendre automa-

tique certains temps de la manipulation ; elle permet en outre le traitement de cultures sur lamelles.

3. Technique de Lejeune [20]. Le choc osmotique est assuré par de l'eau déminéralisée contenant 10 % de sérum ; le fixateur est le liquide de Carnoy, les préparations sont colorées par le bleu de Unna. Cette technique utilise des cultures cellulaires sur lamelles.

B. — *Lecture.*

Le repérage des métaphases est effectué au microscope à l'aide d'un grossissement moyen : objectif 20, oculaire 10.

Les décomptes ont été effectués sur les images projetées sur écran à l'aide d'un appareil-Scopicon.

C. — *Photographies.*

Les métaphases avec bonne dispersion des chromosomes sont photographiées en utilisant les matériels suivants :

- oculaire $\times 10$;
- objectif à immersion $\times 100$;
- microfilm Kodak orthochromatique ;
- révélateur microdol Kodak ;
- fixateur concentré Kodak.

Le tirage sur papier a été réalisé en utilisant le papier photographique Lumière B 11/3.

CHAPITRE II

RESULTATS

Nomenclature des souches cellulaires diploïdes étudiées

L'appellation et l'origine des six souches que nous avons établies sont consignées dans le tableau I.

Désignation des souches	Date de mise en culture	Fœtus	Tissu	Nombre de passages réalisés
Lyon 1	3-2-63	mâle 4 mois	muscle	55
Lyon 2	28-1-63	mâle 2 mois	muscle	34
Lyon 3	8-5-63	mâle 5 mois	muscle	46
Lyon 4	7-5-63	mâle 5 mois	poumon	26
Lyon 5	24-10-63	femelle 4 mois	muscle	41
Lyon 6	25-10-63	femelle 4 mois	poumon	17

TABEAU I

La culture de la souche 1 a été arrêtée au 55^e passage, alors qu'elle était arrivée à un stade avancé de la phase III. Les mitoses étaient rares, la vitesse de reconstitution de la couche monocellulaire extrêmement ralentie. Nous avons considéré avoir atteint la limite de son existence.

Les souches 3 et 5 ont été accidentellement perdues respectivement aux 46^e et 41^e passages. Les phénomènes annonçant le début de la phase III étaient déjà manifestes en ce qui concerne la souche 3.

Caractères des cultures

Ces caractères se sont montrés identiques pour toutes les souches. Après quelques subcultures on observe à l'examen microscopique :

a) au faible grossissement : un aspect caractéristique réalisé par des faisceaux de cellules allongées orientées dans une même direction et qui prennent un aspect tourbillonnant rappelant celui que l'on observe dans les coupes histopathologiques de fibromes ;

b) au fort grossissement : les cellules sont difficiles à observer en raison de leur transparence. Après coloration, elles apparaissent sous forme de cellules fusiformes mesurant environ 180 millimicrons $\times$ 15 millimicrons. Le cytoplasme est finement granuleux ; le noyau ovalaire contient 1 à 4 nucléoles.

MISES EN SUBCULTURES.

Les cellules adhèrent au verre en une heure. La culture se développe rapidement après un temps de latence de 24 heures. Au bout de 30 heures on assiste à l'apparition explosive de très nombreuses mitoses : on observe des cellules arrondies très réfringentes qui sont des cellules en mitose aux différents stades.

Chaque cellule donne naissance à un îlot qui rapidement s'étend. La couche monocellulaire est sans lacune au bout de 3 ou 4 jours. Parallèlement, le milieu accuse une baisse importante du pH.

Evaluation du degré de tétraploïdie

Le taux est basé sur l'examen de 250 métaphases. Les résultats sont consignés dans le tableau 2.

TABLEAU 2

Souche	Pourcentage des métaphases tétraploïdes aux passages N°	
	5-10	20-30
1	1,2	2,2
2	1,6	3,2
3	2,2	1,6
4	3,2	5,0
5	2,2	1,6
6	0,8	non fait

Décompte exact des chromosomes

Il a été effectué sur 200 métaphases après la 20^e génération pour les souches 1, 2, 3. En ce qui concerne la souche 5, la numération a été effectuée dans 100 métaphases avant la 20^e génération et dans 100 métaphases après la 20^e génération. Quant aux souches 4 et 6, elles n'ont été examinées qu'avant la 20^e génération ; le décompte n'a intéressé que 100 métaphases.

Toutes les métaphases ne comprenant pas le nombre de 46 chromosomes ont été réexaminées afin de déterminer si l'absence de chromosomes intéressait un groupe particulier de chromosomes de la nomenclature proposée par la commission de Denver. Il a été possible de conclure que les chromosomes manquants étaient de nature extrêmement variable.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 3.

TABLEAU 3

Souche	Passage n°	Nombre de chromosomes					
		2n-4	2n-3	2n-2	2n-1	2n	2n+1
1	20-25	1	3	8	11	176	1
2	28-34		3	4	9	183	1
3	20-25	4	4	10	12	168	2
4	5-10		3		4	93	1
5	5-10		1	1	3	95	
5	24-27		1	3	4	91	
6	10-15			1	2	97	

Essai de caryotypage

Un essai de caryotypage des souches 3 et 5 a été effectué. Il fait l'objet des planches I et II.

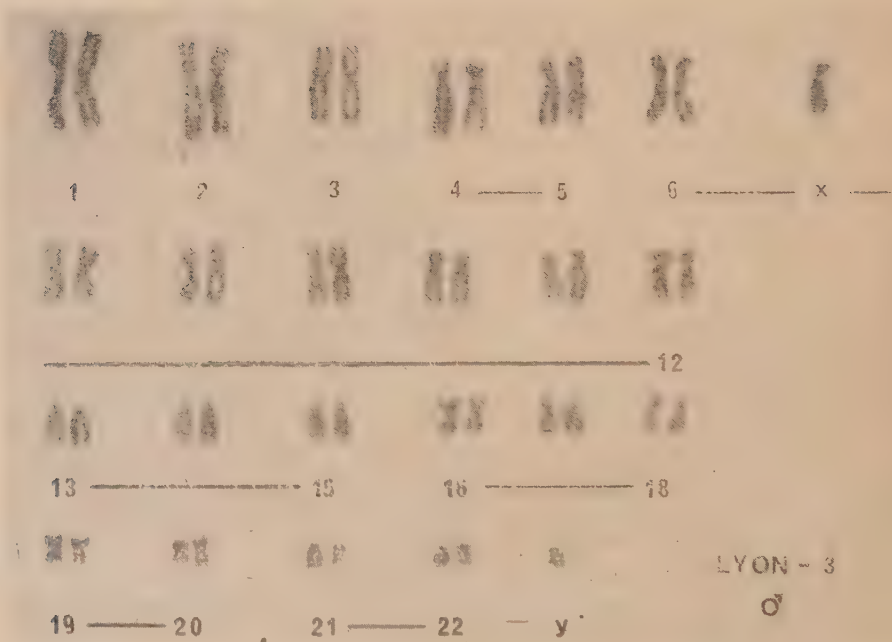
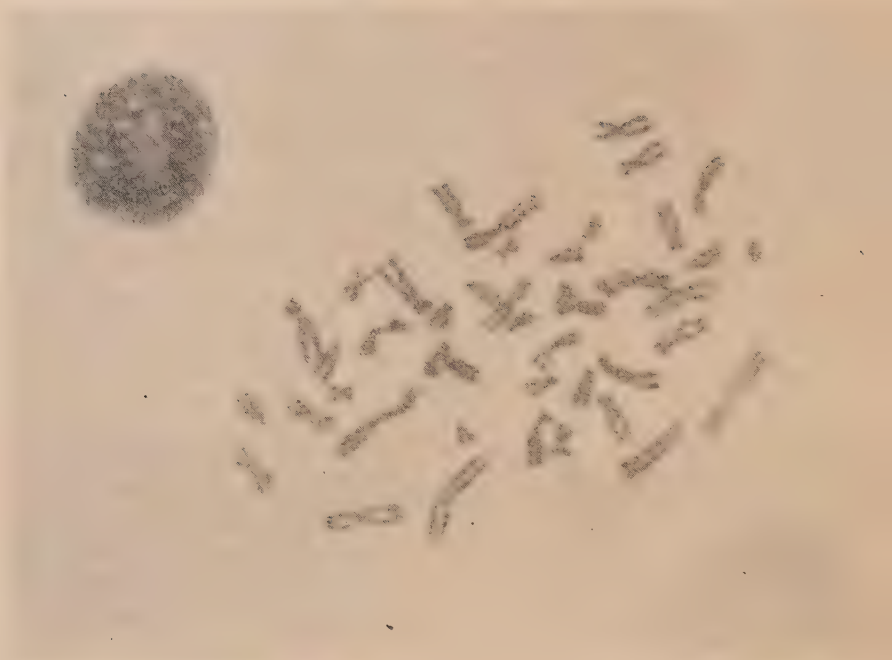


PLANCHE 1

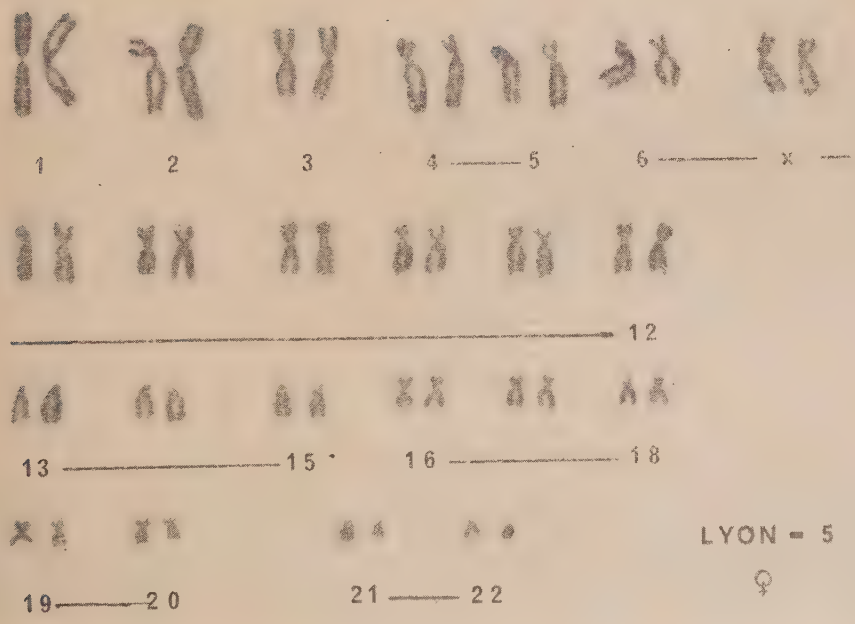
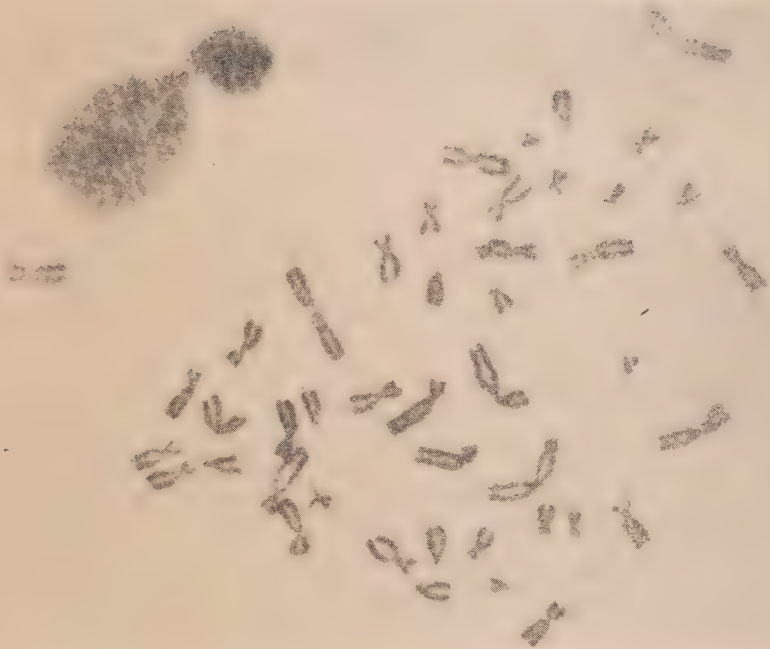


PLANCHE 2

CHAPITRE III

DISCUSSION

Caractères généraux des cultures cellulaires

A. — MORPHOLOGIE DES CULTURES.

Les caractères morphologiques des souches cellulaires que nous avons étudiées n'appellent aucun commentaire particulier. Ils sont en effet identiques à ceux qu'ont décrits Hayflick et Moorhead [14] à propos de leurs souches de cellules diploïdes humaines. Comme nous avons scrupuleusement respecté les techniques de ces auteurs, en particulier la réalisation des subcultures deux fois par semaine selon le mode 2/1, il nous est possible de dire que chaque subculture représente une génération cellulaire. Il convient de remarquer toutefois que l'aspect fibroblastique des cellules et la régularité des noyaux ne signifient pas pour autant que nos cultures ne présentent aucun des stigmates caractérisant les lignées cellulaires. Nous insisterons plus loin sur les réserves qu'il faut faire au sujet de la valeur à accorder à l'observation de l'intégrité de la morphologie des cultures qui peut n'être qu'apparente.

B. — EXISTENCE LIMITEE DES CULTURES.

On sait par définition qu'une souche de cellules diploïdes a une existence limitée. Ce caractère permet de la distinguer d'une lignée cellulaire. On sait également qu'il faut, pour

observer l'extinction d'une souche, réaliser en moyenne une cinquantaine de subcultures : ce qui demande environ six mois. On conçoit qu'il est difficile d'assurer simultanément les subcultures en série de six souches. La mort de la souche n° 1 a pu être observée, la culture a été arrêtée au 55^e passage, alors que les mitoses étaient en nombre très réduit et la vitesse de multiplication extrêmement faible. Les souches 3 et 5 ont été perdues respectivement aux 46^e et 41^e passages en raison d'une contamination par levure, la souche 3 était manifestement entrée dans la phase III depuis 4 passages.

La mort des cultures n'ayant pas été constatée, sauf dans un cas, ce n'est pas sur ce critère que nous nous baserons pour qualifier nos cultures cellulaires de souches diploïdes.

Les subcultures sont en cours ou seront reprises à partir de populations cellulaires appartenant à des générations antérieures que nous conservons dans l'azote liquide.

C. — INFLUENCE DES VARIATIONS DES CONDITIONS DE MILIEU SUR LES CULTURES.

1. — De nombreux auteurs ont beaucoup insisté sur la sensibilité des souches de fibroblastes diploïdes humains aux variations même minimales des conditions de milieu. De fait, certains laboratoires européens se sont heurtés à de grosses difficultés lorsqu'il s'est agi de cultiver des souches de cellules distribuées par le Wistar Institute de Philadelphie. La preuve a été rapidement fournie que ces déboires étaient imputables au milieu de culture.

Certains utilisaient pour préparer le milieu de Eagle des mélanges d'acides aminés et de vitamines conditionnés aux U.S.A., par des firmes spécialisées. Or il a été démontré que la teneur en acides aminés était variable d'une marque à l'autre.

D'autres préparaient le milieu de Eagle en effectuant eux-mêmes les mélanges d'acides aminés et de vitamines.

Dans ce cas encore on a trouvé que les échecs étaient dus à la présence dans certains produits d'impuretés à l'état de traces.

La notion a été finalement admise d'une adaptation possible des souches à une impureté donnée à condition que celle-ci ait été présente lors de la primo-culture. C'est pourquoi on a recommandé d'entretenir autant que possible les souches de cellules diploïdes à l'aide d'un milieu de Eagle toujours préparé avec les mêmes lots de produits.

L'importance de ce problème a paru telle que Eagle a proposé aux laboratoires utilisant les souches diploïdes d'effectuer l'analyse de chacun des constituants du milieu en cas d'échec des cultures [8].

Nous avouons avoir été surpris à l'époque de toutes ces considérations sur le milieu ; nos propres cultures étaient alors conduites avec la plus grande facilité.

Notre opinion a dû être révisée lorsque nous nous sommes trouvés dans l'obligation de nous réapprovisionner en acides aminés et en vitamines en faisant appel aux produits livrés par une firme différente de celle à laquelle nous nous étions adressés jusque-là. Il a été possible de se rendre compte alors à quel point les fibroblastes humains pouvaient plus que tout autre système cellulaire, se montrer sensibles à des variations, même minimales, de la composition du milieu. La situation n'a pu être rétablie qu'en utilisant non plus le milieu de Eagle B M 1955, mais le milieu de Eagle ME M additionné des acides aminés non essentiels [1].

2. — Le pH est un facteur dont l'importance ne saurait être sous-estimée en matière de culture de cellules diploïdes [8]. Il doit, sous peine d'échec, être à 7,4 après quelques heures d'incubation à 37°C. Cet impératif entraîne plusieurs conséquences pratiques. Le pH initial du milieu ne doit pas être trop élevé : un essai montrera facilement la valeur qu'il doit avoir pour se situer à 7,4 en quelques

(1) Nous remercions le docteur Triau (Institut Mérieux) de l'aide qu'il a bien voulu nous accorder dans cette circonstance.

heures à 37°C. Mais ce pH initial dépend lui-même de deux facteurs :

— La concentration de la suspension cellulaire que l'on met en culture : le pH aura tendance à s'élever si la suspension est pauvre en cellules.

— Le type du flacon utilisé. Si la phase gazeuse est trop importante, il est préférable d'employer comme solution saline tamponnée non pas la solution de Earle, mais la solution de Hanks.

Toutes ces considérations précédentes aboutissent à la notion d'une extrême fragilité des cellules diploïdes humaines : la moindre perturbation dans les conditions de milieu entraîne au minimum des altérations dans les lots de chromosomes et au maximum la perte de la culture.

3. — Mais un fait nous a paru remarquable. Cette sensibilité est l'apanage des cultures en voie de multiplication. La couche monocellulaire une fois constituée, se montre au contraire d'une grande résistance. Nous avons pu conserver en survie des cellules diploïdes pendant plus de un mois à l'aide de n'importe quel milieu utilisé habituellement en culture cellulaire, additionné de 3 % de sérum de veau. Ce traitement ne s'accompagnait d'aucune modification apparente de la culture.

Cette propriété est d'un intérêt tout particulier lorsqu'on se propose d'isoler des virus.

4. — De même les cellules diploïdes supportent sans grands dommages la congélation, mais la conservation doit avoir lieu à basse température. A — 70° C, les cellules ne supportent aucune variation même minime de la température. Les essais que nous avons réalisés à l'aide d'un réfrigérateur électrique ont montré que la durée de la conservation n'excédait pas trois mois. Ce fait est probablement imputable aux variations dans le fonctionnement de l'appareil. Un réfrigérateur alimenté par du carboglace

assure le maintien de la température et donnerait en conséquence des résultats meilleurs.

En réalité, toute difficulté dans la conservation des cellules est supprimée par l'emploi de l'azote liquide : nos cultures conservées depuis plus d'une année à -196°C manifestent à la décongélation une activité mitotique comparable à celle que l'on observe dans les subcultures de routine.

*
**

Les souches de cultures de fibroblastes embryonnaires humains, objet de notre étude, possèdent donc tous les caractères morphologiques et culturels des souches de cellules diploïdes.

Données fournies par l'étude des lots chromosomiques

Nous avons mentionné dans la première partie de ce travail que dans une population cellulaire en voie de transformation, la morphologie des cellules subissait d'importantes modifications. Il convient de souligner que ces dernières ne représentent pas un critère dont la valeur est absolue. En effet :

1° On a signalé le cas d'une population cellulaire au sein de laquelle une modification spontanée et stable de la morphologie était intervenue. Cette modification avait un caractère si évocateur que la culture cellulaire était considérée comme une lignée. En réalité, cette transformation de la morphologie ne s'accompagnait d'aucune altération du caryotype [32].

2° Inversement, la culture peut présenter une morphologie normale avec aspect fibroblastique des cellules et orientation en faisceaux tourbillonnants et posséder néanmoins une garniture chromosomique instable [5].

Ces faits montrent l'importance de l'analyse du caryotype des cellules. Cette étude doit être à la fois quantitative et qualitative.

A. — CHOIX D'UNE METHODE DE PREPARATION DES CHROMOSOMES.

L'étude quantitative et qualitative des chromosomes est basée sur l'observation de cellules en mitose aux stades de prométaphase et métaphase.

Les techniques de préparation des chromosomes devront donc atteindre deux buts :

— Offrir à l'observation un nombre élevé de métaphases présentant des lots chromosomiques bien dispersés sans croisement ni superposition ;

— Eviter au maximum la production d'artéfacts dans la morphologie des chromosomes.

1° OBTENTION DES MITOSES AU STADE MÉTAPHASE.

a) *Colchicine.*

La plupart des techniques font appel à la colchicine à la concentration finale de 1/2.500.000, afin de bloquer les mitoses au stade de métaphase. Cette substance, en effet, se montre toxique pour le fuseau dont la formation est inhibée [38]. Mais la colchicine présente l'inconvénient d'entraîner une surcondensation des chromosomes. C'est pour minimiser ce dernier que les temps de contact du produit avec les cellules doivent être réduits à 6 heures au maximum.

b) *Extrait embryonnaire.*

La technique recommandée par Lejeune [20] consiste à stimuler le pouvoir mitotique des cellules d'une culture en voie de multiplication, grâce à l'addition d'extrait

embryonnaire. On obtient ainsi un nombre important de mitoses avec prédominance des prométaphases. Mais on doit remarquer que les extraits embryonnaires hétérologues sont doués de pouvoir cytotoxique lorsqu'on dépasse certaines concentrations. Des altérations de la morphologie des chromosomes peuvent en outre apparaître sous forme principalement de cassure de chromatide [9].

c) *Technique adoptée.*

Nous n'utilisons pour notre part ni l'un ni l'autre de ces procédés. Nous avons souligné au chapitre résultat la densité des mitoses 30 heures après la mise en subcultures. Nous estimons que celles-ci sont suffisamment nombreuses pour que l'on puisse trouver sans difficulté un nombre appréciable de métaphases. La préparation de 10 lamelles permet l'examen d'une centaine de métaphases au sein desquelles la dispersion des chromosomes est satisfaisante, rendant possible un décompte aisé des chromosomes.

2° RÉDUCTION DE LA PRODUCTION D'ARTEFACTS.

Toutes les méthodes comportent les trois temps suivants : dispersion, fixation et aplatissement des chromosomes sur la lamelle ; mais les procédés qui permettent d'obtenir ces résultats sont très traumatisants pour les chromosomes.

a) *Dispersion des chromosomes.*

Elle est habituellement réalisée en plongeant les cellules dans une solution hypotonique. Prunicras [30] a enregistré par microcinématographie les effets de ce choc osmotique sur les cellules en métaphase : en moins de une minute la cellule atteint un état de distension maximum qui ultérieurement demeure stable ou tend au contraire à s'atténuer. Pendant que se déroule ce phénomène, les chromosomes sont projetés dans toutes les directions à l'intérieur de la cellule ballonnée. Cette dispersion s'opère

donc de façon à la fois rapide et brutale. Les tractions exercées sur les chromosomes risquent d'entraîner des ruptures au niveau de certaines régions fragiles des bras.

On conçoit l'intérêt de trouver la technique qui provoque une bonne dispersion des chromosomes sans pour autant les traumatiser.

Prunieras [30] a démontré que le choc osmotique se déroulait dans les conditions optima si celui-ci était réalisé de façon très progressive en utilisant de l'eau déminéralisée strictement neutre et à la température de 20° C. Certains estiment que les traumatismes sont encore réduits si l'eau neutre est additionnée de 10 % de sérum ou de polyvinylpyrrolidone.

b) *Fixation.*

La fixation est le plus souvent réalisée à l'aide d'un mélange acide acétique-alcool méthylique 1/3. La microcinématographie a montré que ce temps se déroulait lui aussi avec une certaine brutalité. La cellule distendue par le choc osmotique peut réagir de deux façons opposées avant même que le liquide fixateur n'arrive à son contact : ou bien elle éclate en libérant les chromosomes qui se dispersent dans une zone plus ou moins étendue, ou bien la cellule se rétracte, annulant ainsi le résultat du choc osmotique. C'est cette dernière éventualité qui intervient le plus souvent.

Tous ces phénomènes sont dus aux vapeurs dégagées par le mélange fixateur. En conséquence, la fixation, pour être peu traumatisante, doit être réalisée de la façon la plus progressive possible.

c) *Dessication.*

Le procédé utilisé pour réaliser ce temps varie selon les auteurs. Rappelons que ce temps a pour but d'aplatir les chromosomes sur la préparation et de conserver leur dispersion.

La dessiccation peut simplement s'opérer à l'air libre.

Certains auteurs accélèrent la dessiccation en soufflant sur la préparation pendant 15 à 20 secondes. D'autres utilisent un procédé beaucoup plus brutal : un flambage de la préparation est effectué immédiatement après la sortie du fixateur, soit à l'aide d'alcool, soit sur la veilleuse d'un bec Bunsen. Cette méthode donnerait d'excellents résultats et accentuerait en particulier les constriction secondaires sur les chromosomes 1, 4, 5, 9 et 16.

Une autre technique consiste à écraser les préparations (squash-preparation).

3° TECHNIQUE ADOPTÉE.

Après avoir essayé plusieurs techniques, nous avons adopté la conduite suivante :

a) Le choc osmotique est réalisé de façon très progressive à l'aide d'un montage analogue à celui de Prunieras [30]. Il est possible ainsi d'assurer le traitement simultané d'une dizaine de lamelles. Nous utiliserons de l'eau permutée à pH 7,0 ; l'opération est conduite à la température du laboratoire.

b) La fixation se déroule dans le même appareil, ce qui permet une fixation lente et progressive. La couche monocellulaire en outre ne manifeste aucune tendance au décollement. Le détachement des cellules de leur support représente en effet le principal écueil de la technique de Lejeune. Ce phénomène est peut-être favorisé par la hyaluronidase que l'auteur recommande d'ajouter à la solution hypotonique destinée à provoquer le choc osmotique. L'emploi de l'appareil de Prunieras évite la mise en œuvre de procédés divers visant à empêcher le décollement de la couche monocellulaire :

— Addition préalable de solution de chlorure de calcium à raison de 0,1 à 0,3 ml pour 5 ml de milieu. On augmenterait ainsi l'adhérence des cellules.

— Séchage partiel de la lamelle à l'air libre avant introduction dans le fixateur.

— Exposition des lamelles pendant 2 secondes aux vapeurs d'acide osmique avec immersion lente dans le fixateur. Comme dans la technique de Lejeune, nous utilisons le fixateur de Carnoy.

c) *Dessication.*

Au sortir du liquide fixateur, la dessication est réalisée en soufflant sur la lamelle de façon modérée.

d) *Coloration.*

Après avoir successivement utilisé l'acéto-orcéine et le Giemsa, nous avons adopté la technique de coloration recommandée par Lejeune [20]. Les raisons de ce choix sont les suivantes :

— L'hydrolyse par l'acide chlorhydrique normal à 60° C nettoie les préparations de façon remarquable.

— La coloration par le bleu de Unna conserve aux chromosomes leur aspect grêle et délicat. Il n'y a pas de risque de surcoloration avec empâtement des chromatides et effacement de l'espace, parfois réduit, qui sépare les bras des chromosomes.

c) *Résultats.*

Outre les avantages offerts par la coloration de Unna, la technique que nous utilisons fournit des préparations qui permettent l'observation de nombreuses métaphases au sein desquelles les chromosomes sont dispersés de façon satisfaisante. Sans doute existe-t-il très souvent un ou deux croisements de chromosomes, mais il s'agit là d'un inconvénient mineur n'apportant aucune complication dans les décomptes.

B. — INTERPRETATION DES RESULTATS DE L'ETUDE QUANTITATIVE DES LOTS CHROMOSOMIQUES.

Il convient de souligner que l'étude quantitative doit, pour être valable, intéresser un nombre important de métaphases. On a calculé qu'il faut observer 194 cellules pour avoir une certitude à 95 % de déceler une seule anomalie dans une population cellulaire contenant une cellule anormale sur 50 [26]. Par ailleurs, l'étude quantitative doit être réalisée en partie après la 20^e génération cellulaire, puisque c'est surtout à partir de ce cap que les anomalies risquent d'apparaître.

1. — SIGNIFICATION DE LA TÉTRAPLOÏDIE.

In vivo chez un sujet normal, il existe toujours un certain nombre de cellules tétraploïdes [14], il en est de même dans les cultures de fibroblastes diploïdes humains. Mais cette anomalie n'est retrouvée, in vivo et in vitro, que dans 3 % en moyenne des métaphases [24].

Une augmentation nette de la tétraploïdie annonce la survenue prochaine d'altérations importantes de caryotype. De fait :

— on a montré qu'elle précède de peu la transformation qui intervient spontanément au sein des cultures cellulaires se transformant en lignée ;

— on a constaté en outre qu'elle était contemporaine des modifications du caryotype qui se manifestent dans une souche cellulaire inoculée avec le virus SV₄₀ [33] et sur lesquelles nous reviendrons plus loin.

Ces faits montrent l'intérêt du décompte des métaphases tétraploïdes.

L'examen du tableau 2 fournit les résultats de la numération des métaphases tétraploïdes au cours des 10 premières

génération d'une part et après la 20^e génération d'autre part pour nos six souches de cellules diploïdes. Chaque décompte a été effectué par l'observation de 250 métaphases.

On note, pour les cultures 1, 2 et 4, une discrète augmentation du nombre des métaphases après la 20^e génération ; celle-ci n'est toutefois pas significative, puisqu'elle n'atteint jamais 8 %, taux limite au-delà duquel la culture cellulaire est considérée comme suspecte.

2° SIGNIFICATION DE L'ANEUPLOÏDIE.

Une cellule somatique normale est à la fois diploïde et euploïde, c'est-à-dire que le nombre de chromosomes est $2n$ et que les chromosomes sont appariables par paires identiques.

Le tableau 3 montre que si la majorité des cellules sont diploïdes, certaines, en revanche, contiennent des lots chromosomiques incomplets ou au contraire augmentés par la présence de 1 ou 2 chromosomes supplémentaires.

L'hypodiploïdie est l'éventualité la plus fréquente. Elle se caractérise le plus souvent par la perte de 1 ou 2 chromosomes et plus rarement par l'absence de 3 ou 4 éléments. Nous avons mentionné au chapitre des résultats que vérification a été faite que les chromosomes absents n'appartenaient pas à un groupe déterminé de la classification de Denver et plus particulièrement aux groupes de chromosomes acrocentriques. C'est qu'en effet l'absence de un ou plusieurs chromosomes peut avoir, selon les cas, une signification différente.

1. — Saksela [33], étudiant l'action du virus SV₄₀ sur des cultures de fibroblastes diploïdes humains, a pu constater que les altérations de la morphologie caractéristique de la transformation de la souche en lignée apparaissaient au bout de 9 à 15 semaines après l'inoculation ; celles-ci

s'accompagnent en outre d'importantes modifications des lots chromosomiques à la fois quantitatives et qualitatives :

— Le nombre des chromosomes est diminué ; il manque un ou plusieurs éléments, mais un fait est remarquable : ce sont toujours les groupes acrocentriques qui deviennent incomplets. Les groupes 13-15 et 21-22 sont les plus fréquemment intéressés, l'atteinte du groupe 17-18 est plus rare.

— Le déficit en chromosomes acrocentriques succède à des modifications de la morphologie des chromosomes qui se traduisent essentiellement par une élévation du nombre de ruptures d'une seule chromatide.

2. — Des déficits dans les lots de chromosomes acrocentriques sont retrouvés dans des cultures cellulaires inoculées avec différents virus. Ils sont en fait la conséquence de toute altération même minime de la viabilité cellulaire. La fragilité particulière de ces autosomes est expliquée par le rôle d'organiseurs nucléolaires que joue cette catégorie de chromosomes [33] ainsi que par la localisation de certains virus, tels que le SV₄₀, autour du nucléole entraînant une interférence avec les processus normaux de la cellule.

3. — L'absence de un ou plusieurs chromosomes peut enfin relever d'une erreur de technique. Nous avons insisté sur les traumatismes subis par la cellule au cours des différents temps de la préparation des chromosomes. Il n'est pas rare d'observer des métaphases étirées avec des chromosomes isolés situés parfois assez loin du lot principal. On conçoit qu'une dispersion trop importante puisse aboutir à la perte d'éléments chromosomiques.

C'est de cette dernière éventualité que paraissent relever les anomalies qui apparaissent dans nos décomptes. De toute façon il convient de remarquer que le taux d'aneuploïdie est toujours nettement inférieur à 20 %, taux qui est considéré comme étant à la limite de la normale.

C. — DIFFICULTES D'UNE ANALYSE QUALITATIVE DU CARYOTYPE.

Les résultats des différentes numérations auxquelles nous nous sommes livrés ne suffisent pas pour affirmer que nos souches de cellules sont exemptes de toute tendance à la transformation. L'étude quantitative des lots chromosomiques doit en effet être complétée par l'étude qualitative de 50 métaphases au moins [24].

L'analyse précise de la morphologie des chromosomes n'a pu être abordée : il s'agit là d'une étude relevant d'une spécialité bien particulière et nécessitant un long entraînement.

Les difficultés commencent dès qu'il s'agit d'apparier les chromosomes et de les classer ensuite en groupes suivant les critères définis par la commission de Denver [2].

a) Certains groupes de chromosomes sont aisés à reconnaître :

- le groupe 1-3 est remarquable par la taille des autosomes et la position médiane du centromère ;

- le groupe 4-5 est facile à identifier grâce à la longueur des éléments et à leur centromère paramédian ;

- les groupes 13-15 et 21-22, qui rassemblent les chromosomes acrocentriques, peuvent être classés sans difficulté ;

- il en est de même pour les groupes 16-18 et 19-20, qui comprennent des autosomes à centromère médian, mais dont la taille va en décroissant.

b) Le groupe 6-X-12, en revanche, englobe des chromosomes difficiles à rassembler par paires et à classer. Ils possèdent tous en effet un centromère paramédian, mais les différences de taille sont difficiles à apprécier pour un opérateur non entraîné.

Les difficultés sont au maximum lorsqu'il s'agit d'apprécier la signification d'une anomalie observée.

Un exemple est fourni par l'interprétation à donner à la rupture de chromatide. Il s'agit là d'une anomalie souvent rencontrée au cours de circonstances diverses :

— Les ruptures de chromatides sont fréquentes dans les souches de cellules diploïdes au moment où elles entrent dans la phase III. Ce sont elles qui constituent même les stigmates les plus précoces de la sénescence d'une souche cellulaire.

— Les ruptures de chromatides en nombre plus important que normalement peuvent également annoncer la transformation d'une souche en lignée et traduire la présence d'un agent mutagène. Le taux de cette altération chromosomique augmente en effet de 7 à 30 % à la suite de l'infection d'une culture par le virus SV₄₀ et nous avons déjà mentionné que cette modification survient un ou deux passages avant que ne se manifeste l'élimination des chromosomes acrocentriques.

— Certaines infections virales entraînent des ruptures de chromatides ; ainsi en est-il de la rougeole [27], de l'herpès [12] et de la varicelle [1].

— Les cassures de chromosomes s'observent également dans les cultures soumises à l'action de certaines substances chimiques ou de radiations ionisantes.

Mais pour pouvoir affirmer une augmentation du taux des ruptures de chromatides, il faut tout d'abord déterminer le pourcentage de cette altération à l'état normal. Or les opinions varient selon les auteurs :

— Certains estiment que les ruptures de chromosomes existent au taux de 2 à 5,4 % dans le sang périphérique des sujets normaux.

— Dans les cultures de fibroblastes diploïdes humains, le taux des ruptures est évalué à 10 % pour les uns et à 21,6 % pour les autres.

Ces différences d'évaluation s'expliquent par les nombreux artéfacts imputables soit aux conditions de culture,

soit encore aux techniques de préparation des chromosomes : on a montré en effet que de nombreuses cassures étaient dues aux conditions physico-chimiques du milieu dans lequel les cellules ont été cultivées [34]. Le choc osmotique, par sa brutalité, peut entraîner des ruptures au niveau des zones fragiles des bras. La technique de photographie a elle-même son importance : certains chromosomes peuvent ne pas être suffisamment révélés et paraître plus courts. Inversement, un excès de révélation peut masquer une cassure [16].

Tous ces faits expliquent que nous n'ayons pu aborder le problème de l'analyse précise des lots chromosomiques de nos cultures cellulaires.

Il convient de souligner enfin que même les résultats d'une telle étude donnent lieu à certaines réserves. Des anomalies peuvent très bien exister qu'il n'est pas possible de mettre en évidence et qui sont pourtant le fait de lignées cellulaires authentiques. L'exemple de la lignée d'Yerganian est à ce sujet particulièrement significatif : la population cellulaire est diploïde, mais sa durée de vie est illimitée [39].

En ce qui concerne les cellules diploïdes humaines, cette éventualité demeure très problématique. Les fibroblastes humains sont en effet connus pour être d'une remarquable stabilité [36] [4] [14]. Ils sont sous ce rapport à opposer aux fibroblastes de souris, qui font preuve au contraire d'une très grande instabilité [21] [31] [37].

Au terme de cette étude, il nous est possible d'avancer que nos cultures de fibroblastes humains sont des souches de cellules diploïdes, mais il nous est impossible d'affirmer qu'elles sont exemptes d'anomalies annonçant l'éventualité rare d'une transformation en lignée.

CONCLUSIONS

Notre travail rapporte l'histoire encore partielle de six cultures de cellules établies à partir de quatre fœtus humains et entretenues en utilisant les techniques décrites par Hayflick et Moorhead.

L'étude concerne quatre cultures de tissu musculaire et deux cultures de tissu pulmonaire.

Les constatations suivantes ont été faites :

1. — Les subcultures, effectuées de façon régulière deux fois par semaine, ont permis dans trois cas d'atteindre la phase de déclin des cultures aux environs de la cinquième génération cellulaire.

2. — La morphologie des cellules, de type fibroblastique, a été conservée au fil des passages, ainsi que les caractères cultureux représentés par l'activité métabolique intense d'une part et la multiplication rapide des cellules d'autre part, qui assure la reconstitution de la couche monocellulaire en trois jours.

3. — L'étude quantitative des garnitures chromosomiques effectuée entre les 20^e et 30^e générations cellulaires a permis de confirmer la stabilité des caractères diploïde et euploïde des cellules.

4. — Ces résultats nous autorisent à qualifier de « souche cellulaire » les six cultures de cellules objet de notre travail.

Vu :
Le Doyen,
J.-F. CIER

Vu :
Le Président de la Thèse,
BERTOYE.

Vu et permis d'imprimer : Lyon, le 3 Juin 1964.

LE RECTEUR, PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ,
P. LOUIS

BIBLIOGRAPHIE

1. AULA P. — *Hereditas*, 1963, 49, 451.
2. BAIKIE A.G., COURT-BROWN W.M., BUCKTON K.E., HARNDEN D.G., JACOBS P.A., TOUGH I.M. — *Nature*, 1960, 188, 1165.
3. CHU E.H.Y., GILES N.H. — *J. Nat. Cancer Inst.*, 1957, 20, 383.
4. CHU E.H.Y., GILES N.H. — *Am. J. Human Genet.*, 1959, II, 63.
5. DEFENDI V., LEHMAN J., KRAEMER P. — *Virology*, 1963, 19, 592.
6. EARLE W.R. — *J. Nat. Cancer Inst.*, 1943, 4, 165.
7. EAGLE H. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1955, 89, 362.
8. EAGLE H. — *Symposium Opatija Yougoslavie*, 24-26 sept. 1963.
9. FREDERIC J., CONIN J. — *C.R. Acad. Sc.*, 1962, 254, 357.
10. GEY G.O., COFMANN W.O., KUBICEK M.T. — *Cancer Res.*, 1952, 12, 264.
11. GERBER P., HOTTLE C.A., GRUBBS R.E. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1961, 108, 205.
12. HAMPAR B., ELLISON S.A. — *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 1963, 49, 474.
13. HAYFLICK L. — *Exp. Cell. Res.*, 1961, 23, 14.
14. HAYFLICK L., MOORHEAD P.S. — *Exp. Cell. Res.*, 1961, 25, 1961.
15. HILLEMAN M.R., HAMPARIAN V.V., KETTER A., REILLY C.M., Mc CLELLAND L., CORNFELD D., STOCKES J. — *J.A.M.A.*, 1962, 180, 445.
16. Hsv T.C. — *Int. Rev. Cytol.*, 1961, 12, 69.
17. HULL R.N., MINNER J.R., MASCOLI C.C. — *Am. J. Hyg.*, 1958, 68, 31.
18. JACOBS P.A., COURT-BROWN W.M., DOLL R. — *Nature*, 1961, 191, 1178.
19. KROOTH R.S., WEINBERG A.N. — *Biocem. Biophys. Res. Comm.*, 1960, 518, 4, 524.
20. LEJEUNE J., TURPIN R., GAUTIER M. — *Rev. fr. Etud. Clin. Biol.*, 1960, 5, 406.

21. LEVAN A., BIESELE J.J. — *Ann. N.Y. Acad. Sc.*, 1958, 71, 1022.
22. LEVINTOW L., EAGLE H. — *Ann. Rev. Biochem.*, 1961, 30, 605.
23. MOORHEAD P.S., NOWELL P.C., MELLMAN W.J., BATTIPS D.M., HUNGERFORD D.A. — *Exp. cell. Res.*, 1960, 20, 613.
24. MOORHEAD P.S. — *Symposium Opatija Yougoslavie*, 24-26 septembre 1963.
25. MOSER H. — *Experientia*, 1960, 16, 385.
26. MULLER H.J. — *Amer. Nat.*, 1923, 57, 66.
27. NICOLS W.W., LEVAN A., HALL B., CESTERGREN G. — *Hereditas*, 1962, 48, 367.
28. NISHIMURA E.T., HAMILTON H.B., KOBURA T.Y., TAKAHARA S., OGURA Y., DOI K. — *Science*, 1959, 130, 333.
29. OHNO S., TRUJILLO J.M., KAPLAN W.D., KINOSITA R. — *Lancet*, 1961, 123, 126.
30. PRUNIERAS M. — *Symposium Opatija Yougoslavie*, 24-26 septembre 1963.
31. ROTHFELS K.H., DARKER R.C. — *J. Exp. Zool.*, 1959, 142, 507.
32. RUDDLE F.H. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1962, 109, 116.
33. SAKSELLA E. — *Symposium Opatija Yougoslavie*, 24-26 sept. 1963.
34. SHARMA A.K., SHARMA A. — *Intern. Rev. Cytol.*, 1960, 10, 101.
35. SWEET B.H., HILLEMAN M.R. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1960, 105, 420.
36. TJIO J.H., PUCK T.T. — *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 1958, 44, 1229.
37. TODARO G.J., GREEN H. — *J. Cell Biol.*, 1963, 17, 299.
38. WHITE M.J.D. — *Les chromosomes*. Dunod, Paris, édit., 1963.
39. YERGANIAN G., LÉONARD M.J. — *Science*, 1961, 133, 1600.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	13
<i>Première partie.</i> — DONNEES FOURNIES PAR LA LITTERATURE	15
Chapitre I. — Caractères fondamentaux des différents systèmes de cultures cellulaires	17
Chapitre II. — Naissance, vie et mort d'une souche de cellules diploïdes humaines	23
Chapitre III. — Utilisation des souches diploïdes humaines ..	29
<i>Deuxième partie.</i> — TRAVAIL PERSONNEL	33
Chapitre I. — Matériels et techniques	35
Chapitre II. — Résultats	41
Chapitre III. — Discussion	47
CONCLUSIONS	63
BIBLIOGRAPHIE	65

